

モルモット関節軟骨の修復

—組織学的, オートラジオグラフィ的及び電子顕微鏡的観察—

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 梶川欽一郎教授)

森 泉 哲 次

(昭和58年3月4日受付)

モルモットの膝関節にパパインを注入し、傷害された関節軟骨の修復過程を1日から8週にわたり光顕、電顕並びに ^3H -チミジンによるオートラジオグラフィを用いて研究した。パパイン注入によって石灰化層を除く軟骨全層にプロテオグリカンの著明な脱出がおり、メタクロマジアとルテニウムレッド陽性粒子の消失が認められた。軟骨細胞は大部分変性に陥ったが、変性を免れた残存軟骨細胞も散在性に認められた。これらの軟骨細胞の核分裂によって共通の細胞領域間質を有する軟骨細胞の集団が形成されたが、このような軟骨細胞の再生は限局性で、軟骨の修復に大きく関与するという証拠はなかった。一方、関節軟骨辺縁の「移行部」の線維芽細胞様細胞が損傷軟骨の表層に増殖し、その深部に向い次第に軟骨細胞へ分化すると共に豊富な細胞間物質を産生し硝子軟骨が形成された。これらの所見から、軟骨細胞の再生能力は微弱で、関節軟骨の修復には軟骨細胞へ分化する能力をもつ「移行部」の間葉細胞が重要な役割をもつことが結論された。

Key words Articular cartilage, Repair, Autoradiography, Electron microscopy.

関節軟骨の修復については、これまで多数の実験的研究が報告されている^{1)~5)8)9)12)~18)}。損傷が軟骨下骨に達した場合には、骨髄から増殖した間葉細胞が軟骨細胞へ分化することによって線維軟骨又は硝子軟骨が形成され、関節軟骨が修復されるものと考えられている^{12)~15)}。しかし、損傷が関節軟骨に限局した場合には、損傷周囲の軟骨細胞が増殖して関節軟骨を修復するという意見¹⁾と、関節軟骨辺縁部の滑膜や軟骨膜の間葉細胞が増殖分化して軟骨組織を形成し、関節軟骨の修復に与かるという意見⁴⁾⁵⁾があり、見解の一致が得られていない。一般に、分化した軟骨細胞の再生力は微弱で、損傷に近接した軟骨細胞は分裂、増殖するものの、小さい再生軟骨細胞集団を形成するに留まり、損傷された軟骨組織を完全に修復するには至らないという意見^{2)3)16)~18)}が支配的である。

以上のような関節軟骨の修復についての意見の不一致は傷害の程度や、損傷の作成方法の差異によるものと思われる。又従来の報告の大部分は光学顕微鏡的観察に基づいており、増殖する細胞種がどのような微細

構造を有しているのか、増殖細胞は分化する際にどのような超微構造的变化をとげ、軟骨に特有な細胞間基質を形成するのかについては断片的な報告がなされているのにすぎない¹²⁾¹³⁾。著者はこれらの諸問題を明らかにするために、パパインを関節腔内に注入して限局性軟骨損傷を作成し、関節軟骨の修復過程を光学顕微鏡(光顕)、電子顕微鏡(電顕)及び光顕的オートラジオグラフィを用いて観察したので報告する。

材料および方法

成熟 Hartley 系雌モルモット(500~700 g)を用いて、1側の膝関節腔に生理的食塩水に溶かした1%パパイン(Sigma, crude powder, type II)溶液0.1 mlを注入し、他側の膝関節腔には同量の生理的食塩水を注入し対照とした。パパイン溶液及び生理的食塩水は注入直前に0.45 μ 孔のミリポアフィルター(Millipore, Bendford)で濾過後使用した。注入後1, 4日, 1, 2, 3, 4, 6, 8週にそれぞれ2~4匹ずつ屠殺し材料を採取した。

Repair of the Articular Cartilage of the Guinea-pig: A Histological, Autoradiographic and Electron Microscopical Observation. Tetsuji Moriizumi, Department of Pathology (I), (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

電顕的観察：電顕材料として膝関節腔を露出後脛骨関節軟骨内側部を滑膜を含めて摘出し、2.5%グルタルアルデヒド(0.1 M カコシル酸ソーダ緩衝液 pH 7.4)で4°C, 60 分間固定後、2%オスミウム酸(同緩衝液 pH 7.4)で90 分間固定を行った。次いでエタノール系列で脱水、エポン 812 で包埋した。超薄切片はダイヤモンドナイフを用い、LKB ウルトラトーム(8800 型)で作成し、酢酸ウラニール・硝酸鉛の二重染色を行った。一部の材料はルテニウムレッド(RR)染色⁶⁾とタンニン酸染色⁷⁾を行った。試料は日立 HU-500 型電子顕微鏡を使用し直接倍率 1,200~15,000 で撮影した。

光顕的観察：膝関節全体を 0.5% の割合に Cetyl pyridinium chloride を含む 10% 中性ホルマリン液で 3~5 日間固定後、0.5 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic Acid) で脱灰しパラフィン切片を作成した。切片は H.E. (Hematoxylin and Eosin), トルイジン青(pH 7.0), アルシアン青(pH 2.5) 及び鍍銀染色を施し観察した。又電顕用のエポン包埋試料から 1 μ m 切片を作成しトルイジン青染色を行った。

光顕的オートラジオグラフィ：パバイン注入 4 日、1, 2, 4 週後に膝関節腔に 0.1 μ Ci/体重 g の ³H-チミジン(RCC Amersham, 比活性度 40~60 Ci/mmol) を注入し、40 分後に膝関節全体を採取した。組織を 10%ホルマリン液で固定し、0.5 M EDTA で脱灰後パラフィン切片を作成した。脱パラフィンを行った切片を Kodak 乳剤 NTB-3 で dipping し乾燥後、暗箱内(4°C)で 2~4 週間露出した。露出後 Kodak D-19 で 15°C, 4 分間現像し、Kodak 定着液で 15°C, 5 分間定着し水洗後、H.E. 及びトルイジン青染色を施した。

成 績

I. 対照群

1. 光顕所見

関節軟骨は軟骨細胞の形態、配列及び細胞間物質の染色性の違いから表層、中間層、深層及び石灰化層の 4 層に分けられる。表層には 1 層の扁平な細胞が関節面に対して平行に存在し、細胞間のメタクロマジアは陰性である。中間層の細胞は 1~2 層の類円形の細胞からなり、しばしば対をなして存在する。深層では、3~5 層の類円形の細胞が石灰化層に向い次第に柱状配列を示す。石灰化層には 1~2 層の類円形の細胞が存在する。中間層、深層、石灰化層の細胞間はメタクロマジア陽性であるが、細胞領域(軟骨小腔)は領域間部に比べてより強い陽性を示す。軟骨細胞には ³H-チミジンのとりこみは認められない。

関節軟骨は辺縁部において線維性組織へ移行するが、この移行部には少数の紡錘形細胞と膠原線維が存在す

る。³H-チミジンのとりこみは紡錘形細胞の少数に認められる。

2. 電顕所見

関節軟骨表層の細胞は扁平で細胞小器官の発育は乏しく、少数の指状突起を有している。中間層の細胞は類円形で多数の指状突起を有し、原形質は広く糸粒体、粗面小胞体、ゴルジ装置がよく発達している。ことにゴルジ装置の発育は著明で、ゴルジ空胞にはしばしば細線維状物質の凝集が認められる。又ライソゾーム様小体や多胞体もまれに観察される。深層の細胞は中間層の細胞と類似するが、脂肪滴とグリコーゲンがしばしば存在する。

細胞間物質は膠原線維とプロテオグリカンから構成される。プロテオグリカンは粒子(直径 20~30 nm)とフィラメント(直径 5~15 nm)からなる RR 陽性物質として同定される(図 1)。中間層と深層の細胞は細胞領域を有しているが、表層細胞には認められない。細胞領域には上記の RR 陽性物質とごく少数の膠原線維が含まれ、その横紋は不明瞭で、後述の領域間部の

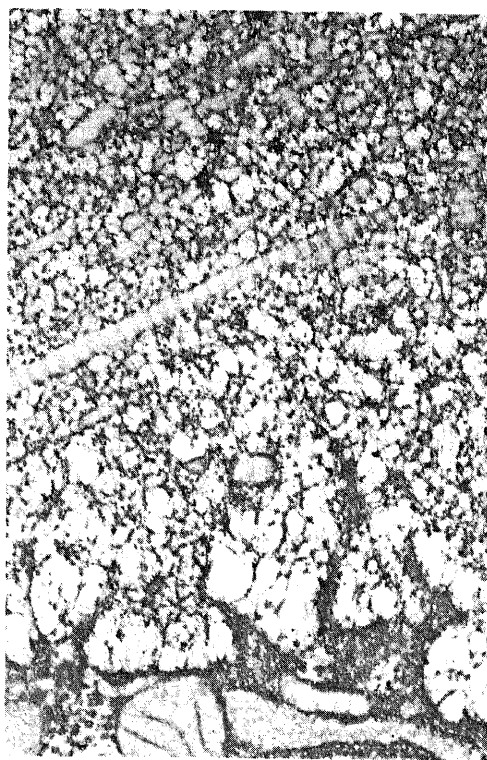


Fig.1. The intercellular matrix of a normal articular cartilage, showing collagen fibrils embedded in abundant ruthenium red-positive particles and filaments. Ruthenium red stain. $\times 30,000$.

膠原線維に比較して直径 13~20 nm と細い。領域間部の膠原線維は表層では関節面に平行に並び中間層では配列が不規則で、深層では垂直に配列する。線維の直径は表層 25 ± 9 nm, 中間層 33 ± 10 nm, 深層 44 ± 20 nm で、深層に向うに従い次第に線維の直径は増加する。

関節軟骨辺縁の移行部には少数の紡錘形細胞が観察されるが、小器官の発育は乏しく糸粒体、粗面小胞体及びゴルジ装置が少数認められる。細胞間には膠原線維(直径 40~50 nm)が線維束を形成して存在する。線維束周辺にはマイクロフィブリル(直径約 10 nm)が認められる。

II. 実験群

1. 光顕所見

1). 1~4 日

パパイン注入によって石灰化層を除く関節軟骨全層が変性に陥り、細胞間質のメタクロマジアは完全に消失する(図2)。このような変化は中央部では辺縁部に比べてその程度が強く、中間層に達する亀裂も時に認められる。同時に細胞配列は不規則となり表層、中間層、深層の区別が不明瞭となる。大部分の軟骨細胞は萎縮状を呈し、しばしば消失する。しかし変性を免れた細胞も散見される。これらの残存細胞はむしろ腫大し、まれに有糸核分裂と ^3H -チミジンのとりこみが認められる。4 日では残存細胞の周囲にメタクロマジア陽性物質の沈着が認められる。

移行部においては、4 日から核分裂を伴った紡錘形細胞の増殖が認められ、 ^3H -チミジンの活発なとりこみが観察される(図3)。

2). 1~3 週

関節軟骨中央部では変性が進行する。この時期では

しばしば軟骨の亀裂が石灰化層近くまで及ぶ。軟骨細胞は 1~4 日に比べ広範囲に消失し、残存軟骨細胞は少数認められるにすぎない。これらの残存細胞の細胞配列は不規則で、まれに核分裂と ^3H -チミジンのとりこみが認められ、メタクロマジアは細胞周囲のみ陽性である。

辺縁部の表層には移行部から増殖した結合組織が認められる(図4)。この組織は毛細血管と多数の紡錘形細胞と狭い細胞間質からなる。紡錘形細胞には核分裂と ^3H -チミジンのとりこみがしばしば認められる。紡錘形細胞は下部に向うに従い次第に類円形の軟骨細胞へと分化し、細胞間にメタクロマジア陽性物質が沈着し、表層の結合組織の下部に硝子軟骨が形成される。この再生軟骨の軟骨細胞には大小があり、配列は不規則である。

3). 4~8 週

中央部の変化は 1~3 週の変化とほぼ同様であるが、特に 3~10 個の軟骨細胞からなる細胞集団が散在性に観察される。これらの細胞集団を構成する細胞には、まれに ^3H -チミジンのとりこみが認められる(図5)。細胞集団はメタクロマジア陽性の広い細胞領域を形成するが、領域間部ではメタクロマジアは陰性である。変性軟骨下部の骨には骨芽細胞の増殖と骨梁の肥厚が認められる。しかしこのような変化は後述する再生軟骨下部の骨には認められない。

辺縁部では移行部から増殖した紡錘形細胞は減少し、軟骨細胞が不規則に並ぶ肥厚した再生硝子軟骨が形成される。中央部に行くに従って下層の軟骨細胞はほぼ柱状に配列する。しかし層の区別は明らかでなく、細胞密度は高く、このため再生軟骨は対照に比べ約 2 倍

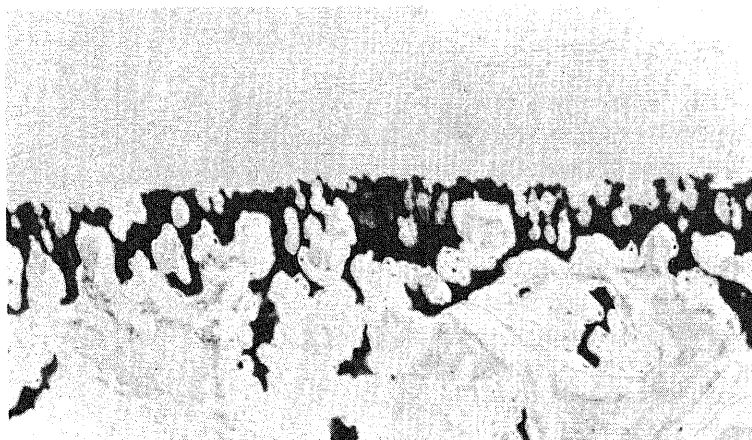


Fig. 2. Articular cartilage at the 1st day after papain injection. Loss of metachromasia is evident in the entire thickness except in the calcified zone. Toluidine blue stain. $\times 90$.

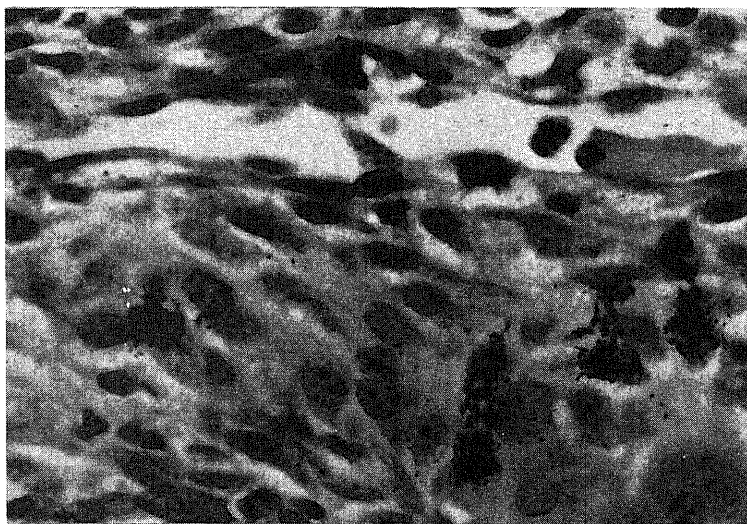


Fig. 3. Tritiated thymidine autoradiograph obtained 4 days after papain injection, showing intense thymidine uptake in the spindle cells of the transition zone. H. E. stain. $\times 370$.

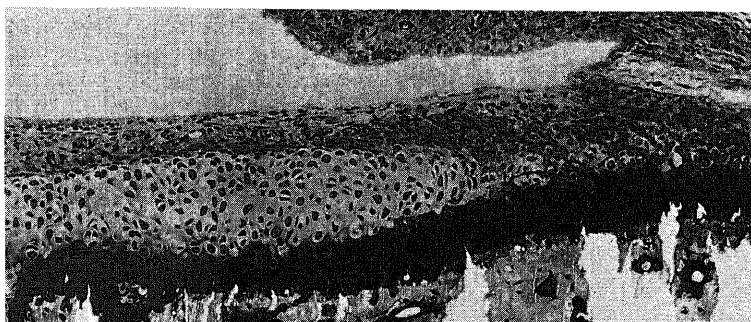


Fig. 4. A picture at the 2nd week after papain injection, showing extension of the connective tissue from the transition zone and regenerating hyaline cartilage in the underlying area. Note the cellularity and irregular arrangement of the chondrocytes. Epon embedded $1\mu\text{m}$ thick section. Toluidine blue stain. $\times 90$.

に肥厚する(図6)。メタクロマジアは表層の軟骨を除いて陽性で、細胞領域では特に強陽性を示す。

2. 電顕所見

1). 1～4日

軟骨細胞は少数の細胞を除いて変性に陥る。変性細胞は萎縮状を呈し、核には不規則な入りこみが出現する。小器官は減少しゴルジ装置も目立たない。脂肪滴が増加し、しばしば原形質全体を占めることもまれではない。又、ライソゾーム様小体や空胞の増加が著明で、糸粒体は腫大又は萎縮し、クリスタには変形がみられる。変性を免れた残存細胞では原形質は腫大し、ゴルジ空胞の増加と粗面小胞体の発達が認められ、脂肪滴やライソゾーム様小体も増加する。

軟骨基質には、残存細胞の周囲以外はプロテオグリ

カンは全く認められない(図7)。膠原線維はやや密集する。又後述のように、まれに太い膠原線維が変性細胞に近接して観察される。

移行部に増殖した紡錘形細胞は核小体が明瞭で、細胞質にはリボゾームが比較的豊富である。細胞間には線維束を形成する膠原線維(直径 $40\sim 50\text{nm}$)とマイクロフィブリルが認められる。

2). 1～3週

中央部では大部分の軟骨細胞は変性細胞の形態を示す。表層では細胞は脱落し膠原線維が直接露出し、しばしば線維の間隙が異常に広い。残存軟骨細胞は少数認められ、その周囲にはプロテオグリカンの沈着が認められる。又1～4日と同様に変性細胞に近接して太い膠原線維が観察される。

光顕的に示されるように、移行部から辺縁部表層に多数の紡錘形細胞を含む結合組織が増殖する。これらの紡錘形細胞は粗面小胞体の発達した線維芽細胞様細胞の形態を示す(図8)。細胞間には少数の膠原線維(直径 26 ± 8 nm)が疎に存在し、線維周辺にはマイクロフィブリルが認められる。線維間にはRR陽性のフィラメント(直径 $15 \sim 30$ nm)で満たされる。この結合組織の下部にはゴルジ装置がよく発達し指状突起を有する軟骨細胞の形態をとる細胞が認められる(図9)。細胞間には膠原線維が多く存在し粒子とフィラメントからなる

RR陽性物質も認められるが、細胞領域は区別されない。さらに下部では小器官と指状突起の発育がより著しく、細胞領域を備えた軟骨細胞が増加する(図10)。この軟骨細胞はよく発達した粗面小胞体とゴルジ装置をもつ。ゴルジ装置は原形質に広く存在し小胞、層板、空胞は明瞭で、層板は互いに吻合し、処々空胞と連続する。小胞と粗面小胞体の連続も認められる。細胞周囲には粒子(直径 $20 \sim 30$ nm)とフィラメント(直径 $5 \sim 15$ nm)からなるRR陽性物質の豊富な細胞領域が区別される(図11)。領域間部では膠原線維は下部においてより密であるがその配列は不規則である。線維の直径は 31 ± 9 nm で中間層の線維に近い値を示す。線維間にはRR陽性の粒子とフィラメントからなるプロテオグリカンが沈着する。

3). 4～8週

中央部は変性軟骨からなるが、処々数個の軟骨細胞の集団が認められる(図12)。この細胞集団を構成する軟骨細胞はそれぞれの細胞領域を有しながら互いに密着しているが形態は様々である。小型の細胞は一般に核小体が明瞭で小器官の発育が乏しく、粗面小胞体と小さなゴルジ装置を備えている。大型の細胞にはよく発達した粗面小胞体とゴルジ装置や、多胞体やライソゾーム様小体及びグリコーゲンが認められる。細胞集団の周囲には粒子とフィラメントからなるRR陽性物質が豊富に沈着し細胞領域が区別される。細胞集団からはなれた領域間部には、細い膠原線維(直径 $15 \sim 30$ nm)の密な集合が限局して観察される(図13)。又前述したが太い膠原線維が変性細胞に近接して認められる(図14)。線維の直径は $75 \sim 1,000$ nm(平均 300 nm)



Fig. 5. Autoradiograph of the articular cartilage at the 4th week after papain injection, showing thymidine uptake in the chondrocyte in cluster. H. E. stain. $\times 370$.

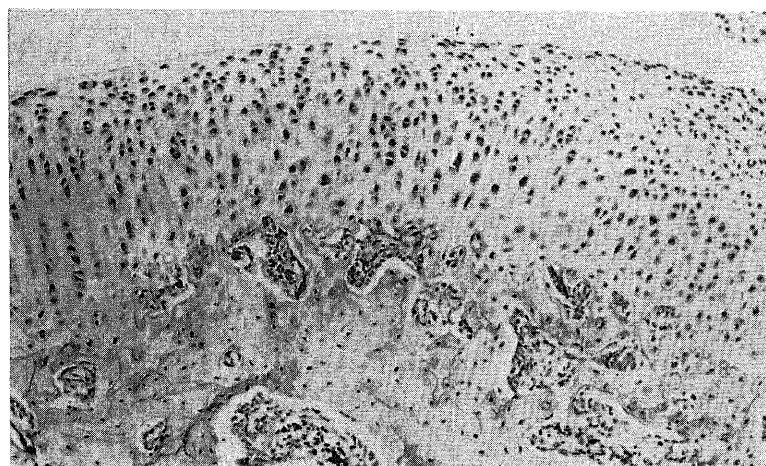


Fig. 6. Reparative and hypertrophic hyaline cartilage seen 4 weeks after papain injection. Columnar arrangement of cartilage cells is constituted. H. E. stain. $\times 90$.



Fig. 7. Intercellular matrix at the 1st day after papain injection. Disappearance of ruthenium red-positive particles and filaments and aggregation of collagen fibrils. Ruthenium red stain. $\times 30,000$.

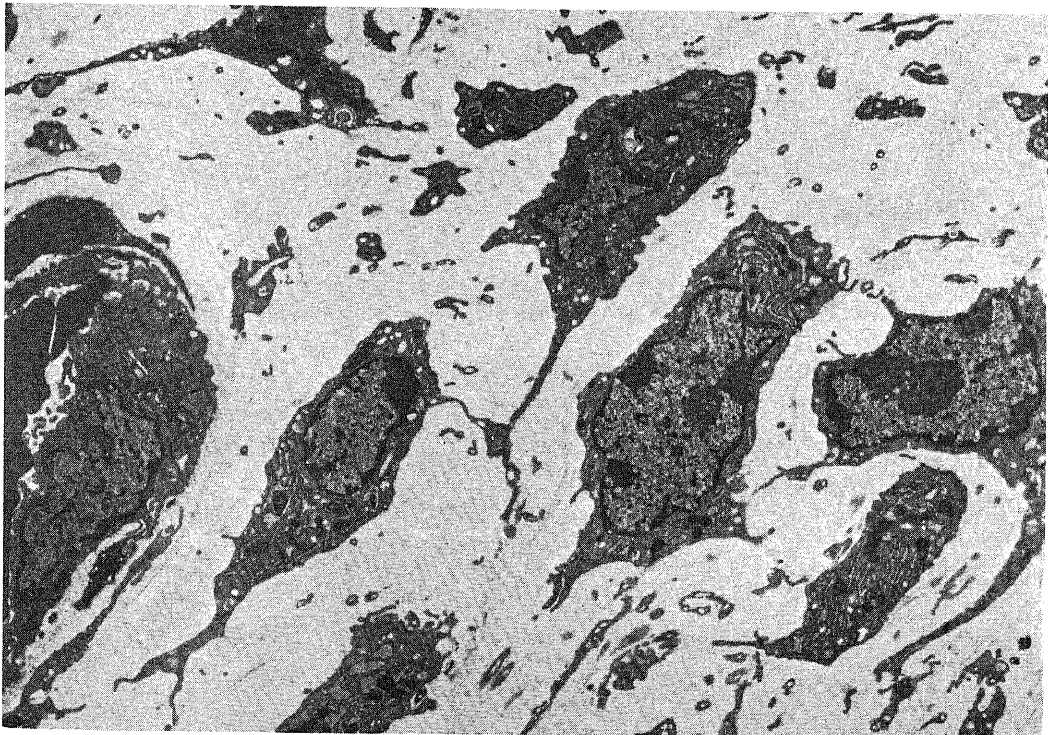


Fig. 8. Fibroblast-like cells proliferating from the transition zone on the articular cartilage at the 1st week after papain injection. $\times 4,500$.

で、横紋周期は 70 nm と正常である。この線維は紡錘形を呈し線維先端では細線維はほぐれる像が観察される。線維間には高電子密度の細胞崩壊物が少数認められる。

軟骨辺縁では移行部から増殖した線維芽細胞様細胞の大部分は軟骨細胞へ分化し、肥厚した硝子軟骨が中央部の変性軟骨に接して形成される。再生軟骨表面は線維芽細胞様細胞に代って 2～3 層の扁平な細胞で被われ(図 15)、下部に向うに従い類円形の軟骨細胞が細胞領域をもってほぼ柱状に配列する。しかし、再生軟骨では正常軟骨に比べて細胞数が多く、軟骨各層の区別が明らかでない、細胞間は正常軟骨と同様な膠原線維とプロテオグリカンで占められる。

考 察

I. 関節軟骨の修復機序

関節軟骨が傷害された場合には、3 種類の細胞、すなわち軟骨細胞¹⁾⁸⁾⁹⁾、移行部間葉細胞⁴⁾⁵⁾¹⁰⁾¹¹⁾及び骨髄間葉細胞^{12)~15)}が軟骨の修復に関与することが知られている。しかし、これらの細胞の中でどの細胞が最も軟骨の修復に与かるかについては、軟骨損傷の部位とその程度によって異なるものと思われる。本研究ではパパインによる軟骨損傷後、移行部における間葉細胞の増

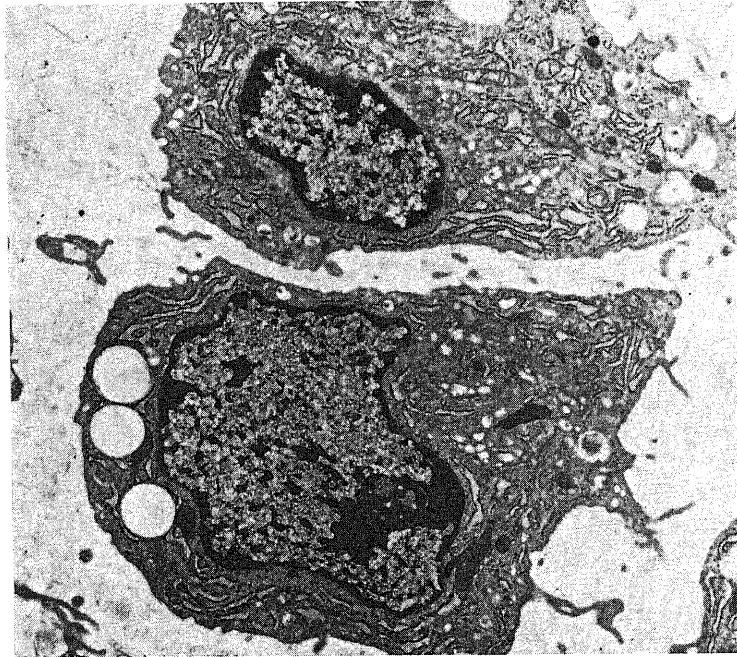


Fig. 9. Moderately differentiated chondrocytes found 3 weeks after papain injection, characterized by development of Golgi apparatus and fine cytoplasmic processes. $\times 6,400$.

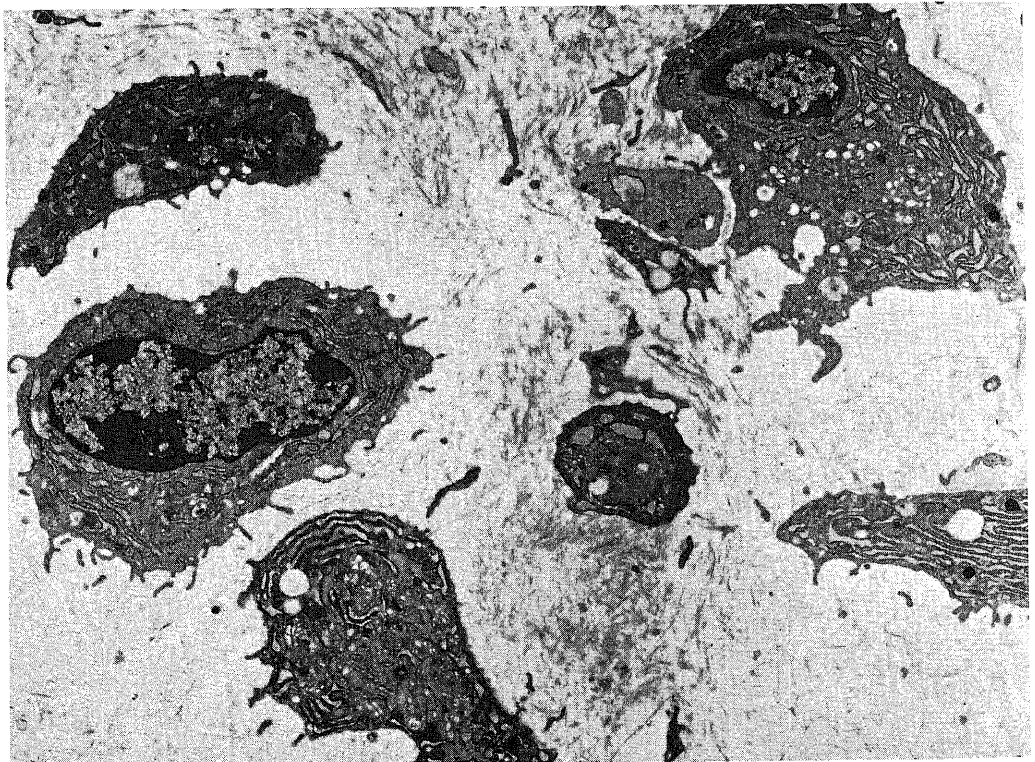


Fig. 10. Regenerated cartilage cells seen 3 weeks after papain injection. The Golgi apparatus is well developed and extracellular cartilage matrix is formed. $\times 5,500$.

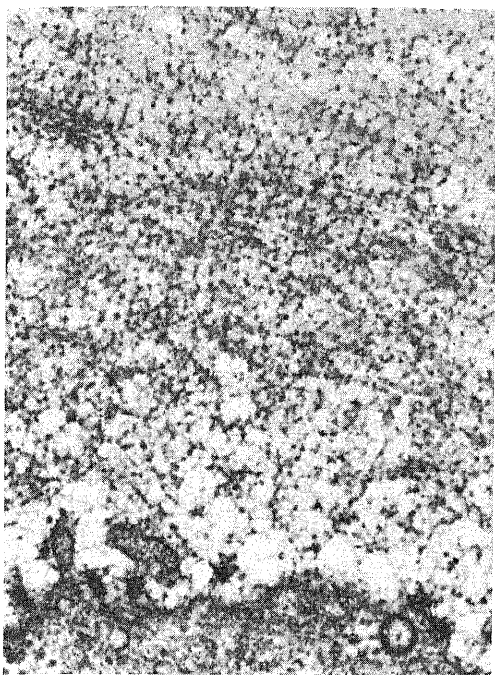


Fig. 11. Intercellular matrix of regenerated hyaline cartilage at the 3rd week after papain injection. Deposits of ruthenium red-positive particles and filaments are evident. Ruthenium red stain. $\times 30,000$.

殖が注目された。この間葉細胞は正常状態においては小器官の乏しい細胞であるが、軟骨損傷後核分裂によって増殖する。増殖した細胞は始めは粗面小胞体の発達した線維芽細胞様の構造を呈し線維性の細胞間物質を産生するが、次第に軟骨細胞へ分化するにしたがってプロテオグリカンが増加し硝子軟骨が形成されることが観察された。この所見から移行部には軟骨細胞へ分化する能力をもつ間葉細胞が含まれており、軟骨に傷害が加わると増殖、分化し軟骨の修復に与かるものと考えられる。この成績は Tonna¹⁹⁾, Öberg ら²⁰⁾の³H-チミジンを用いたオートラジオグラフィ的研究及び Bennett ら⁹⁾の組織学的研究の結果と一致する。しかし、中央部の軟骨では変性が強く 8 週後においても完全には修復がおこななかった。これは移行部からの間葉細胞の増殖が中央部にまで及ばないためであると考えられる。

軟骨細胞が関節軟骨の修復にどの程度関与するかについては意見の一致が得られていない。Calandruccio ら¹¹⁾は軟骨細胞の増殖によって関節軟骨が再生されうると報告している。しかし Mankin²¹⁾¹⁷⁾, Meachim³⁾, Fuller ら¹⁶⁾, Klosterman¹⁸⁾は軟骨細胞の再生能力は弱く、傷害された関節軟骨を再生することはできないと主張している。本研究ではパパイン注入後 4 日及び 1～3 週において、変性を免れた残存軟骨細胞に³H-チミジンの

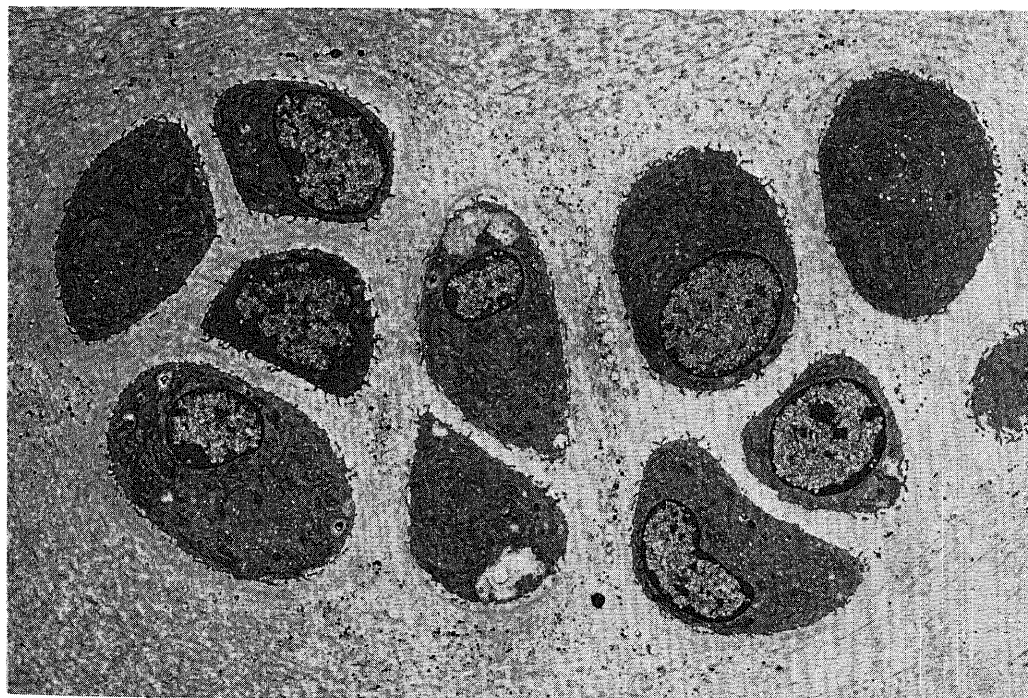


Fig. 12. Chondrocytes in cluster at the 4th week after papain injection. Chondrocytes have a well developed rough endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. $\times 2,500$.



Fig. 13. Interterritorial matrix of degenerated articular cartilage at the 4th week after papain injection, showing accumulation of fine collagen fibrils. $\times 6,300$.

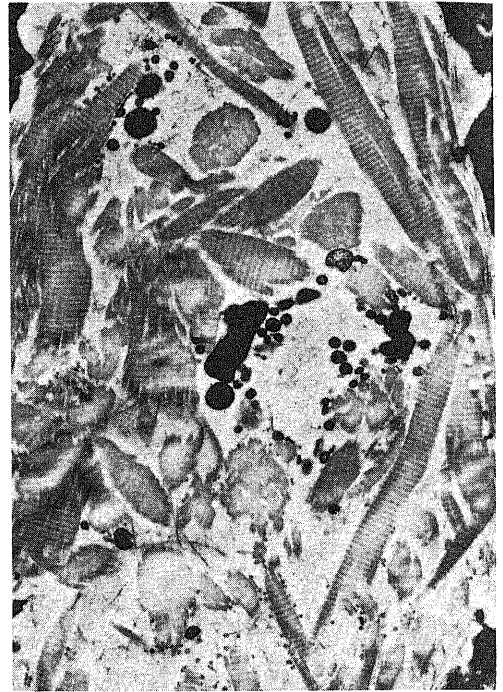


Fig. 14. Unusually thick collagen fibers found 6 weeks after papain injection. They are spindle-shaped and have a distinct 70 nm periodicity. $\times 10,800$.



Fig. 15. Regenerated articular cartilage at the 4th week after papain injection. Superficial flattened cells and subjacent differentiated chondrocytes. $\times 4,800$.

とりこみと核分裂が観察されたが、それらはいずれも甚だ少数の細胞に限られていた。4週以降において軟骨細胞の集団が形成されたが、この細胞集団は散在性に観察されたにすぎなかった。したがって多くの研究者^{23)16)~18)}が報告するように、軟骨細胞の増殖は細胞集団の形成に留まり関節軟骨の修復には大きな役割を果たしていないものと考えられる。

骨髄間葉細胞によって関節軟骨が修復されるという報告^{12)~15)17)18)}は多い、これらの報告によれば、骨髄間葉細胞による軟骨の修復は損傷が骨髄まで及んだ場合におこるとされている。本研究では骨髄間葉細胞が軟骨の修復に関与する所見は認められなかったが、これはパパインによる軟骨損傷が骨髄まで及ばないためで当然の結果と考えられる。中央部では、4週以降変性軟骨下部の骨に骨芽細胞の増殖と骨梁の肥厚が認められた。一般にプロテオグリカンは軟骨の弾力性保持に関係し、軟骨に加わる荷重に拮抗する作用を有している²¹⁾²²⁾。そのためプロテオグリカンが著明に減少した中央部の変性軟骨では、荷重に対して軟骨が拮抗できず、その結果軟骨下骨に荷重がかかり、骨芽細胞の増殖と骨梁の肥厚がおこるものと推定される。

II. 細胞間質の変化

軟骨辺縁部に増殖した線維芽細胞様細胞の間質は少数の膠原線維とRR陽性のフィラメントで構成される。しかし、線維芽細胞様細胞が次第に軟骨細胞へ分化するに従い、細胞間には膠原線維の数の増加と共にRR陽性の粒子とフィラメントからなるプロテオグリカンが沈着し硝子軟骨が形成された。細胞小器官の変化では、ゴルジ装置の発達が最も顕著な変化であった。ゴルジ装置がプロテオグリカン産生に与かる小器官であることはよく知られており²³⁾²⁴⁾、本研究でみられたゴルジ装置の発達は活発なプロテオグリカン産生を反映する形態学的変化であると考えられる。

パパイン注入後光顕的にメタクロマジア陽性物質の消失に対応して電顕的には粒子とフィラメントからなるRR陽性物質の消失が認められた。パパインによって軟骨細胞にも変性がみられた。変性細胞は萎縮状を呈し小器官の減少と脂肪滴の増加がみられたが、残存細胞は腫大しゴルジ空胞の増加と粗面小胞体の発達が観察された。このような小器官の変化に対応して、残存細胞周囲にはメタクロマジア陽性物質及び粒子とフィラメントからなるRR陽性物質の出現がみられ細胞領域が形成された。Shepardら²⁵⁾の研究でも同様な結果が得られている。又軟骨細胞集団の細胞周囲にもメタクロマジア陽性物質とRR陽性の粒子とフィラメントが豊富に沈着し大きな細胞領域が形成された。これらの所見は軟骨細胞の一つの修復反応と思われる

が、これらの既存の軟骨細胞による修復はごく限られた小範囲に止まることは前に述べた通りである。

変性軟骨では、膠原線維の離開がみられ、その程度が強い所では石灰化層近くまで及ぶ亀裂が観察された。線維のこのような変化は関節腔に垂直配列を示す深層の線維が露出し縦に裂目ができる結果であると思われる。

膠原線維の変化として、太い線維が変性細胞に近接して観察された。Seegmillerら²⁶⁾は軟骨異栄養症を呈する突然変異マウスの骨端軟骨に、Weiss²⁷⁾は高齢者及びヒト変形性関節症に、Akisakaら²⁸⁾はメッケル軟骨に同様な太い線維を報告している。この線維はプロテオグリカンの減少した軟骨にみられ²⁶⁾²⁷⁾、又石灰沈着が伴われる²⁸⁾ことから軟骨基質の変性の結果形成されるものと考えられている²⁹⁾。本研究でもこの線維はプロテオグリカンの減少した軟骨基質に存在しさらに変性細胞周囲に認められることから、太い線維の形成には軟骨基質の変性が関与していると思われる。しかし、変性軟骨では、硝子軟骨に固有のII型コラーゲンに代ってI型のコラーゲンが合成されるという報告³⁰⁾があり、一般にI型コラーゲンは太い膠原線維に凝集するので、変性軟骨にみられた太い膠原線維はI型コラーゲンの産生の結果かも知れない。

又軟骨細胞集団の領域間部に、細い膠原線維の限局性沈着が観察された。これはRüttner³¹⁾らが報告する微小瘢痕に相当するもので高齢者及びヒト変形性関節症において観察されている。本研究でも、この線維の沈着は変性軟骨以外には認められないことから軟骨の変性と関係があるものと思われるが、その形成機序は不明である。

結 論

モルモットの関節腔にパパインを注入し、傷害された関節軟骨の修復過程をパパイン注入後1日から8週にわたり光顕、電顕及びオートラジオグラフィを用いて研究し、以下の結果を得た。

1. パパイン注入によって石灰化層を除く軟骨全層にプロテオグリカンの完全な消失がおこり、大部分の軟骨細胞は変性に陥った。

2. 軟骨損傷後、4日から移行部の間葉細胞の増殖が開始され、そこから変性軟骨の表層に増殖した線維芽細胞様細胞は次第に軟骨細胞へと分化すると共に細胞間に膠原線維とプロテオグリカンの豊富な軟骨基質が沈着し硝子軟骨が形成された。このような軟骨の再生は移行部に近い辺縁部の軟骨にみられたが、中央部の軟骨では変性が強く、8週後においても完全には修復はおこななかった。

3. 残存軟骨細胞の一部に増殖がみられ、再生軟骨細胞の集団が散在性に形成されたが、その数は少なく軟骨の修復には大きく関与しないものと考えられた。

4. 軟骨の修復に骨髄の間葉細胞の関与は認められなかった。しかし、変性軟骨下部の骨には骨芽細胞の増殖と骨梁の肥厚がみられた。

謝 辞

御指導と御校閲を賜りました恩師梶川欽一郎教授に深謝の意を表します。また、研究遂行に際して御助言、御協力を戴きました教室員各位と電子顕微鏡室技術員の方々に厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Calandruccio, R. A. & Gilmer, W. S.: Proliferation, regeneration, and repair of articular cartilage of immature animals. *J. Bone Joint Surg.*, **44A**, 431-455 (1962).
- 2) Mankin, H. J.: Localization of tritiated thymidine in articular cartilage of rabbits. II. Repair in immature cartilage. *J. Bone Joint Surg.*, **44A**, 688-698 (1962).
- 3) Meachim, G.: The effect of scarification on articular cartilage in the rabbit. *J. Bone Joint Surg.*, **45B**, 150-161 (1963).
- 4) Fisher, A. G. T.: Some researches into the physiological principles underlying the treatment of injuries and diseases of the articulations. *Lancet*, **2**, 541-548 (1923).
- 5) Bennett, G. A., Bauer, W. & Maddock, S. J.: A study of the repair of articular cartilage and the reaction of normal joints of adult dogs to surgically created defects of articular cartilage, "joint-mice" and patellar displacement. *Am. J. Pathol.*, **8**, 499-523 (1932).
- 6) Luft, J. H.: Ruthenium red and violet. I. Chemistry, purification, method of use for electron microscopy and mechanism of action. *Anat. Rec.*, **171**, 347-368 (1971).
- 7) Kajikawa, K., Yamaguchi, T., Katsuda, S. & Miwa, A.: An improved electron stain for elastic fibers using tannic acid. *J. Electron Microsc.*, **24**, 287-289 (1975).
- 8) Seggel, R.: Experimentelle Beiträge zur Anatomie und Pathologie des Gelenkknorpels. II. Studien über Knorpelwunden und Defekte. *Deutsche Ztschr. Chir.*, **75**, 453-466 (1904).
- 9) Carlson, H.: Reactions of rabbit patellar cartilage following operative defects. *Acta Orthop. Scand.*, **28** (Suppl.), 318-320 (1957).
- 10) Sokoloff, L.: The biology of degenerative joint disease, 1st ed., p63, The University of Chicago Press, Chicago, 1969.
- 11) Ham, W.: Histology, 7th ed., p456, Lippincott Co., Philadelphia, 1974.
- 12) Hadhazy, C., Benkő, K. & Balogh, P. A.: Studies on cartilage formation. XII. Electron microscopic investigation on cartilage neoformation. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.*, **19**, 323-338 (1968).
- 13) Ghadially, F. N., Fuller, J. A. & Kirkaldy-Willis, W. H.: Ultrastructure of full-thickness defects in articular cartilage. *Arch. Pathol.*, **92**, 356-369 (1971).
- 14) Hjertquist, S. O. & Lemperg, R.: Histological, autoradiographic and microchemical studies of spontaneous healing of osteochondral articular defects in adult rabbit. *Calcif. Tissue Res.*, **8**, 54-72 (1971).
- 15) Meachim, G. & Roberts, C.: Repair of the joint surface from subarticular tissue in the rabbit knee. *J. Anat.*, **109**, 317-327 (1971).
- 16) Fuller, J. A. & Ghadially, F. N.: Ultrastructural observations on surgically produced partial thickness defects in articular cartilage. *Clin. Orthop.*, **86**, 193-205 (1972).
- 17) Mankin, H. J.: The reaction of articular cartilage to injury and osteoarthritis. *N. Engl. J. Med.*, **291**, 1285-1292 (1974).
- 18) Klosterman, E. J.: Hyaline cartilage repair and surgical application. *J. Am. Podiatry Assoc.*, **68**, 178-181 (1978).
- 19) Tonna, E. A.: The cellular component of the skeletal system studied autoradiographically with tritiated thymidine (^3H -TDR) during growth and aging. *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **9**, 813-824 (1961).
- 20) Öberg, T., Fajers, C. M., Lokmander, S. & Friberg, U.: Autoradiographic studies with H^3 -thymidine on cell proliferation and differentiation in the mandibular joint of young guinea pig. *Odontol. Revy*, **18**, 327-342 (1967).
- 21) Kempson, G. E., Muir, H., Swanson, S. A. V. & Freeman, M. A. R.: Correlations between stiffness and the chemical constituents of cartilage on the human femoral head. *Biochim. Biophys.*

Acta, 215, 70-77 (1970).

22) Hamerman, D., Rosenberg, L. & Schubert, M.: Diarthrodial joints revisited. J. Bone Joint Surg., 52A, 725-774 (1970).

23) Fewer, D., Threadgold, J. & Sheldon, H.: Studies on cartilage. V. Electron microscopic observations on the autoradiographic localization of ^{35}S in cells and matrix. J. Ultrastruct. Res., 11, 166-172 (1964).

24) Godman, G. C. & Lane, N.: On the site of sulfation in the chondrocyte. J. Cell Biol., 21, 353-366 (1964).

25) Shepard, N. & Mitchell, N.: The localization of articular cartilage proteoglycan by electron microscopy. Anat. Rec., 187, 463-476 (1977).

26) Seegmiller, R., Ferguson, C. C. & Sheldon, H.: Studies on cartilage. VI. A genetically determined defect in tracheal cartilage. J. Ultrastruct. Res., 38, 288-301 (1972).

27) Weiss, C.: Ultrastructural characteristics of osteoarthritis. Fed. Proc., 32, 1459-1466 (1973).

28) Akisaka, T. & Imanishi, I.: Banded collagen fibrils in the matrix of Meckel's cartilage. J. Electron Microsc., 30, 336-338 (1981).

29) Hough, A. J., Mottram, F. C. & Sokoloff, L.: The collagenous nature of amianthoid degeneration of human costal cartilage. Am. J. Pathol., 73, 201-216 (1973).

30) Gay, S., Müller, P. K., Lemmen, C., Remberger, K., Matzen, K. & Kühn, K.: Immunohistological study on collagen in cartilage - bone metamorphosis and degenerative osteoarthritis. Klin. Wschr., 54, 969-976 (1976).

31) Rüttner, J. R. & Spyrycher, M. A.: Electron microscopic investigations on aging and osteoarthritic human cartilage. Pathol. Microbiol., 31, 14-24 (1968).

Repair of the Articular Cartilage of the Guinea-pig: A Histological, Autoradiographic and Electron Microscopical Observation Tetsuji Moriizumi, Department of Pathology (I), (Director: Prof. K. Kajikawa), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920 - J. Juzen Med. Soc., 92, 334-345 (1983)

Key words: Articular cartilage, Repair, Autoradiography, Electron microscopy,

Abstract

The repair of the articular cartilage following papain injection into the articular space of the knee joints of guinea-pigs was studied by light and electron microscopy, as well as by autoradiography using tritiated thymidine, at various intervals during the period from 1 day to 8 weeks after injection. Papain injection rapidly produced complete degradation of cartilage proteoglycans except for those in the calcified layer, as evidenced by disappearance of metachromasia and loss of ruthenium red-positive particles. Although the majority of chondrocytes were also destroyed, there were observed scattered foci of survival chondrocytes. These chondrocytes showed mitotic cell division with resultant formation of cell clusters surrounded by a common territorial matrix. Such a chondrocytic regeneration, however, occurred in confined areas and hence did not seem to play a major role in the repair of cartilage tissue. On the other hand, fibroblast-like cells proliferated from the "transition zone" of the joint onto the surface of the damaged cartilage. Growing toward deeper portion, they differentiated into chondrocytes with the formation of abundant intercellular matrix to produce hyaline cartilage. From these findings it was concluded that chondrocytes possess only a little capacity for regeneration and that multipotent mesenchymal cells grown from the "transition zone" are largely involved in the repair of the articular cartilage.